

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Sintetska biologija i njezina primjena

Synthetic Biology and its application

Seminarski rad

Zoran Marinković

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study in Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2011.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	3
2. SINTETSKA BIOLOGIJA.....	5
2.1. <i>Od sistemske do sintetske biologije i natrag</i>	5
2.2. <i>Što je to zapravo sintetska biologija?</i>	6
2.3. <i>Tehnologije potrebne za sintetsku biologiju</i>	7
2.4. <i>Problemi s kojima se suojava sintetska biologija</i>	9
2.5. <i>Pitanje bioetike, biozaštite i biosigurnosti</i>	10
3. PRIMJENA SINTETSKE BIOLOGIJE	11
3.1. <i>Sintetski genetički putevi</i>	11
3.2. <i>Sintetski metabolički putevi</i>	13
3.3. <i>Je li sintetska genomika stvorila novi sintetski život?</i>	15
3.4. <i>iGEM</i>	17
4. ZAKLJUČAK.....	19
5. LITERATURA	20
6. SAŽETAK	21
7. SUMMARY	21

1. UVOD

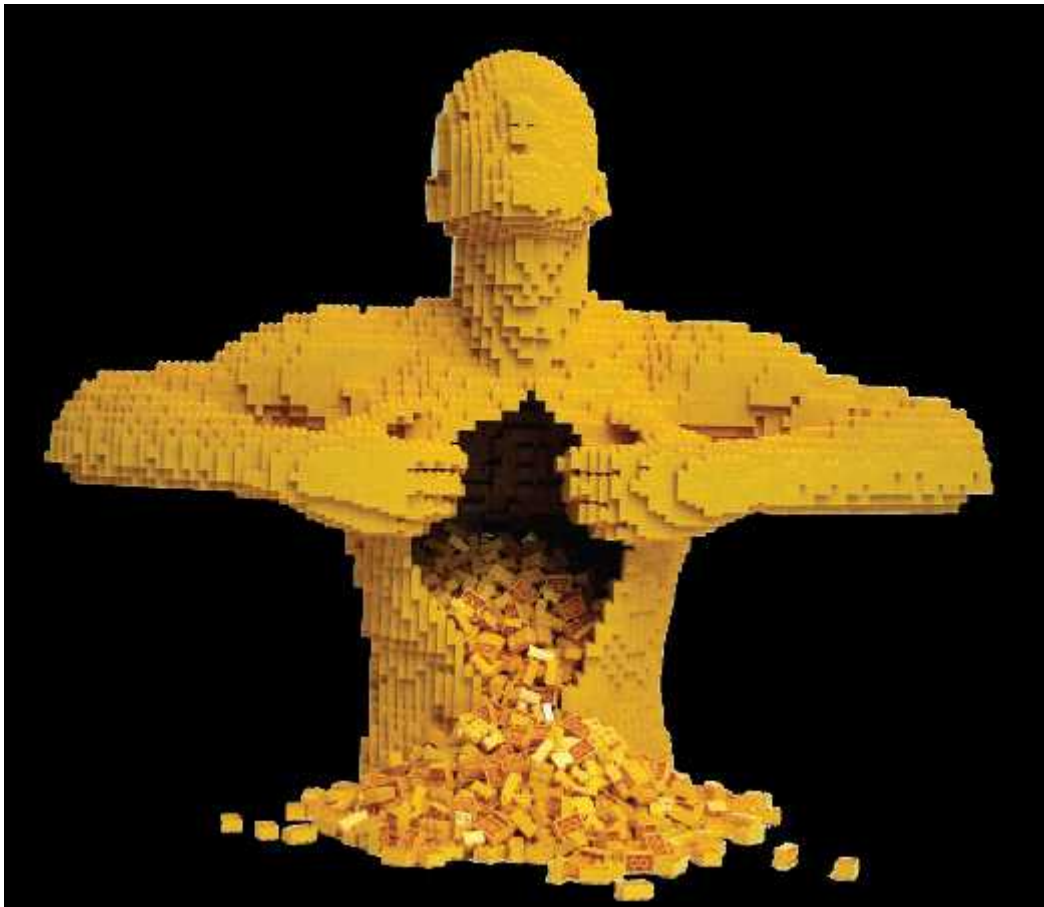
Za razliku od fizike i kemije u kojima se promjena znanstvene paradigme s opisivanja prirodnih fenomena na primjenu tih istih fenomena dogodila već u devetnaestom stoljeću u (Elowitz i Lim 2010.), u biologiji je ta promjena tek u začetima. Zapravo, mogli bismo reći da je to viši stupanj koji biologija kao znanost koja proučava žive sustave tek treba dosegnuti. Zgrabiti u taj metafizički prostor pitanja života i ograničiti ga spoznajama fizičkog svijeta. Iskoristiti znanja koja je dobila promatranjem i opisivanjem živih sustava za stvaranje novih, do sada nepostojećih, sintetskih živih sustava.

U dvadesetom stoljeću inženjerstvo je dovelo do napretka i primjene u mnogim područjima poput proizvodnje, elektronike, komunikacije, transporta, informatike, itd. Biološki sustavi su, u usporedbi s inženjerskim sustavima, puno kompleksniji i njihovi mehanizmi su manje poznati. Povijesno gledano, problemima u biologiji se prilazilo kroz redukcionističku perspektivu koja je potpuno drugačija od metodologija koje koriste inženjeri. Taj redukcionistički pristup je pretpostavio da se može složiti slagalica, odnosno dobiti cjelovita slika koja funkcionira. Takav pristup dominira biologijom s velikim napretkom u akumuliranju bioloških informacija na razini genetike i proteina. Međutim, to je spor i iscrpljujući proces koji ne uspijeva adekvatno pristupiti cjelovitoj kompleksnosti živih sustava i od ograničenog je značaja za biološke sustave u cjelini. U zadnje vrijeme se shvaćaju ograničenja takvog redukcionističkog pogleda na svijet te je potrebna nova paradigma sistemske biologije koja bi dovela do dubljeg razumijevanja funkcioniranja gena, proteina i regulacije unutarstaničnih puteva koje se ne može dobiti proučavanjem pojedinih dijelova tih sustava. Također se shvatilo da su biologija i inženjerstvo jako slični na sustavnoj razini što je stvorilo temelj za stvaranje sintetske biologije, odnosno korištenje inženjerstva unutar bioloških sustava (Slika 1.).

Ekspanzija biologije kao znanstvene discipline koja proučava prirodne organizme na području je potencijalnih organizama imala tri dugoročna uinka (Elowitz i Lim 2010.). Prvo, proširiti zajednicu biologa na znanstvenike koji imaju različite pretpostavke, metode i ciljeve,

poput inženjera. Drugo, promjeniti se na inu na koji znanstvenici prilaze fundamentalnom pitanju funkcioniranja biološkog sustava. Treće, pružiti se novu konceptualnu bazu na inu na koji se u i biologija.

Konvencionalna biologija fokusirana je na shvaćanje struktura, mehanizama i porijekla postoje ih bi a što uključuje mnogo memoriziranja nomenklature i činjenica što ponekad prekriva uvid u jedinstvene principe i koncepte. Umjesto toga u itelj bi mogao zapo eti svoje poučavanje biologije s pitanjem „kako biste izgradili biološki sustav koji izvršava neku funkciju?“, u enici bi trebali odgonetnuti principe po kojima funkcionira neki sustav, odnosno kako bi se biološke komponente mogle iskoristiti za ostvarenje kompleksnih funkcija.



Slika 1. Ilustrativni prikaz građe uvijek od komponenti Lego kockica. (Elowitz i Lim 2010.)

2. SINTETSKA BIOLOGIJA

2.1. Od systemske do sintetske biologije i natrag

Sistemska biologija je disciplina koja svoj nagli razvoj započinje tek u zadnjih desetak godina. Ona zauzima holističku perspektivu objašnjavanja različitih bioloških fenomena naspram redukcionističke perspektive koja ima hendikep da ne može sagledati biološke funkcije u svojoj kompleksnosti i međuzavisnosti u organizmu. Zbog toga je sistemska biologija nužno interdisciplinarna znanost koja obuhvaća, integrira i analizira različite discipline poput fenomike, genomike, epigenomike, transkriptomike, proteomike, metabolomike, glikomike, lipidomike, interaktomike itd. Ona proizvodi velike količine podataka koji moraju biti obrađeni i kvantificirani pri čemu je nužna suradnja znanstvenika svih profila prirodnih i tehničkih znanosti, od matematičara do bioinformatičara i molekularnih biologa.

Sistemska i sintetska biologija nastaju kao dva komplementarna pristupa koja ostvaruju napredak u biologiji i koriste principe inženjerstva. Iako one pristupaju biološkim problemima s naglaskom na različite stvari, one su zapravo dvije strane iste medalje. Odnosno kako je to prisposobio Pengcheng Fu u knjizi „Systems biology and synthetic biology“ koriste i starokinesku filozofiju, sistemska i sintetska biologija možemo promatrati kao Yin i Yang u istraživanju i razvoju ove nove biološke paradigme. Sistemska biologija ovisi o tehnologijama koje se koriste u sintetskoj biologiji kako bi poremetila i promatrala odgovore živih sistema, dok s druge strane sintetska biologija ovisi o znanju dobivenom pomoću pristupa systemske biologije kako bi dizajnirala i implementirala različite modele. Njihov je razvoj, stoga, cikličan – shvaćanje koje donosi sistemska biologija i kreacija koju donosi sintetska biologija se konstantno poboljšavati i mijenjati jedna drugu.

2.2. Što je to zapravo sintetska biologija?

Sam izraz *sintetska biologija* je 1974. godine iskoristio Waclaw Szybalski kako bi opisao modifikacije organizama dodavanjem ili uklanjanjem gena. U to vrijeme to je bilo nazivano „geneti kim inženjerstvom“ ili „tehnologijom rekombinantne DNA“. Promjenom gena organizam bi reagirao na nov na in. U to je vrijeme Szybalskijeva sintetska biologija izazivala strah. Grad Cambridge u Massachusettsu je potpuno zabranio geneti ko inženjerstvo. Više od tri desetljeća iskustva su pokazala da su rizici zanemarivi, a nagrade ogromne (Benner 2008.).

Interesantno je da je 20 znanstvenika, u članku „What’s in a name?“ koji je 2009. godine objavljen u časopisu *Nature Biotechnology*, na pitanje da definiraju sintetsku biologiju dalo isto toliko različitih odgovora. To pokazuje kako je sintetska biologija jako široka grana čije granice još u potpunosti nisu jasne.

Sintetska biologija je grana znanosti koja je nastala tek nedavno. Ona koristi principe i metode inženjerstva kako bi dizajnirala i konstruirala nove biološke dijelove, naprave i sustave s novim funkcijama u živim bićima koje ne postoje u prirodi. Primjerice stvaranje novih biogoriva, lijekova ili sintetiziranje novih cjepiva, ali i stvaranje fundamentalnog shvaćanja bioloških sustava. Sam konačan cilj joj je ujedno grandiozan i kontroverzan, a to je stvaranje novih formi života. Ova „inženjerska“ biologija ovisi o alatima i dijeli ih s geneti kim inženjerstvom, bioinženjerstvom i sistemskom biologijom te s brojnim drugim inženjerskim disciplinama. Sintetska biologija je također različita od navedenih disciplina kako u uvidu tako i u pristupu. Pomoću sintetske biologije ne samo istraživati efekte modifikacija u genima i metabolizmu ili stani ne odgovore na genetsku varijaciju ili promijenu u okolini, nego se mogu dizajnirati i sagraditi biološki sustav s novim staničnim funkcijama kombinirajući i *in silico* i *in vivo* eksperimentalne pristupe.

Dva su bitna temelja koja definiraju sintetsku biologiju (<http://syntheticbiology.org/>). Prvi je dizajn i konstrukcija novih bioloških dijelova, naprava i sustava koji do sada ne postoje u prirodi, a drugi je redizajn postojećih, prirodnih bioloških sustava s korisnom svrhom. Odnosno specifičnije, sintetska biologija želi dizajnirati i sagraditi biološke sustave koji procesiraju

informaciju, manipuliraju kemijskim tvarima, stvaraju materijale, stvaraju energiju, pružaju hranu i održavaju i pojačavaju ljudsko zdravlje i naš okoliš.

2.3. Tehnologije potrebne za sintetsku biologiju

Postoji nekoliko ključnih tehnologija, odnosno uvjeta koji su važni za rast i razvoj sintetske biologije, a mogli bi se podijeliti u dvije skupine – dizajn i izrada:

Znanje. Još nismo dosegli toliko duboko znanje o biološkim sustavima što ima kao posljedicu da do sada genetika i inženjerstvo (u sintetskobiološkom smislu) nije bilo moguće. Tek nedavna otkrića u postgenomskim istraživanjima pružaju nadu da će prije ili kasnije postojati dovoljna količina znanja koja će nam omogućiti usmjereno inženjerstvo u biologiji.

Kompjuterski dizajn. U sintetskoj su biologiji nužni kompjuterski alati koji nam omogućavaju na kompjuterima bazirani (re)dizajn bioloških dijelova, naprava i sustava koji su svojevrsni ekvivalent softverskom paketu CAD (computer-aided design, dizajn potpomognut računalom) koji se koristi za dizajn pomoću alata dostupnih u područjima mehanikog i civilnog inženjerstva. Takav alat za dizajn trebao bi uklopiti dostupno detaljno znanje u program koji bi bio „user-friendly“ te bi tako znanje bilo preneseno iz prostora istraživanja u prostor inženjerstva. Također su u sintetskoj biologiji alati za dizajn temeljeni na matematičkim modelima koji realistično reproduciraju ponašanje bioloških sustava. Koriste i takav softver inženjer bi mogao pokušati poboljšati ponašanje biološkog sustava *in silico* tako da prilagodi različite parametre. S obzirom da prvi matematički modeli tek sada postaju dostupni (npr. za opisivanje transkripcije i translacije gena ili kinetiku metaboličkih i signalnih puteva) potrebno je još mnogo istraživanja kako bi se dobili precizni alati za dizajn. Važno područje u kompjuterskom dizajnu je i dizajn proteina te predviđanje enzimske aktivnosti i selektivnosti iz 3D proteinske strukture što je još uvijek tek u začetcima.

Standardizacija. Dostupnost standardnih dijelova je još jedan uvjet za dizajn u pravom inženjerskom smislu. Dijelovi, naprave i sustavi koji su spremljeni u bazu podataka trebaju imati standardizirano sučelje tako da inženjer može iskoristiti te module za dizajn. Prva takva baza

podataka u sintetskoj biologiji je napravljena na američkom sveučilištu MIT i naziva se MIT Registry of Standard Biological Parts (<http://parts.mit.edu/>).

Sekvenciranje DNA. Sintetski biolozi koriste sekvenciranje DNA na nekoliko načina. Prvo, sekvenciranje genoma nastavlja davati veliku količinu informacija o prirodnim organizmima. Te informacije daju bogati temelj na kojem se mogu sagraditi dijelovi i naprave za sintetsku biologiju. Drugo, sintetski biolozi koriste sekvenciranje kako bi potvrdili da su proizveli sustav kakav su željeli proizvesti. Treće, brzo, jeftino i pouzdano sekvenciranje može omogućiti brzu detekciju i identifikaciju sintetskih sustava i organizama.

Sinteza DNA. Vrijeme, trud i trošak su iznimno važna ograničenja s kojima se susreću sintetski biolozi kada žele proizvesti sekvence gena. Kako bi ubrzali ciklus dizajna, proizvodnje, testiranja i redizajna, sintetski biolozi trebaju bržu i pouzdaniju *de novo* sintezu DNA i slaganje fragmenata DNA. U zadnje vrijeme se značajno poboljšala brzina, točnost i cijena *de novo* kemijske sinteze DNA tako da će ova ograničenja uskoro nestati.

Nositelj i kloniranje velikih DNA. Nakon što smo sintetizirali nove lance DNA potrebno je integrirati ih u organizam. To znači da nam treba pogodan organizam i način kako da ugradimo DNA u organizam. Za to su nam potrebni reducirani genomi modelnih organizama koji bi bili sposobni primiti velike komade sintetizirane DNA.

Mjerenje. Precizno i točno kvantitativno mjerenje svojstava bioloških sustava je važno kako bismo poboljšali shvaćanje biologije. Takva mjerenja nam često pomažu kako bismo objasnili kako radi biološki sustav i pružili bazu za konstrukciju i potvrđivanje modela. Razlike između predviđenog i izmjerenog ponašanja sustava mogu ukazati na rupe u shvaćanju i objasniti zašto se sintetski sustavi ne ponašaju uvijek onako kako je predviđeno. Tehnologije poput mikroskopije i protonecitometrije koje omogućuju mnogo paralelnih i o vremenu ovisnih mjerenja će biti jako korisne u sintetskoj biologiji.

2.4. Problemi s kojima se suojava sintetska biologija

Mnogo biologije stoji na putu inženjerstvu u sintetskoj biologiji. Znanstvenici koji se bave sintetskom biologijom definirali su pet ključnih izazova (Kwok 2010.):

Mnogi dijelovi su nedefinirani. Biološki dio može biti bilo što od sekvence DNA koja kodira specifični protein do promotora koji omogućava ekspresiju gena. Problem je što mnogi dijelovi nisu dobro karakterizirani. Nisu uvijek testirani kako bi se vidjelo što rade, a i onda kada jesu njihovo ponašanje može biti različito u različitim tipovima stanica i različitim laboratorijskim uvjetima. Primjerice u MIT Registry of Standard Biological Parts nalazi se preko 5000 bioloških dijelova. Za oko 1500 dijelova je, od strane osoba koje nisu stavile taj dio u bazu podataka, potvrđeno da rade. Oko 50 ih ne radi, a za oko 200 su prijavljeni određeni problemi. Nije poznato koliko je ostalih dijelova testirano.

Biološki krugovi su nepredvidivi. Čak i kada je poznata funkcija svakog dijela, moguće je da dijelovi neće raditi kada se spoje. Zbog toga sintetski biolozi često moraju koristiti metodu pokušaja i pogreške. Primjerice kada su znanstvenici izradili „prekidač“ („toggle switch“) bile su im potrebne tri godine kako bi sustav proradio. Htjeli su napraviti stanicu koja eksprimira jedan gen, zatim da se unosom kemijskog signala taj gen ugasi i da po ne ekspresija drugog gena. Međutim, drugi gen se nije htio kontinuirano ekspimirati nego se uvijek vraćala ekspresija prvog gena. Razlog tome je bio taj što promotori ta dva gena nisu bili u balansu, tako da je promotor prvog gena uvijek nadjačao promotor drugog gena. Kompjutersko modeliranje bi moglo pomoći u reduciranju takvog pogađanja. Dizajn ne radi uvijek savršeno tako da se nesavršenosti mogu ublažiti procesom koji se zove usmjerena evolucija. U tom procesu se mutiraju DNA sekvence, pregledavaju se njihove performanse te se odabiru najbolji kandidati sve dok se sistem ne optimizira.

Povećanje kompleksnosti. Što su sustavi veći to je proces njihove izrade i testiranja teži i kompleksniji. Znanstvenici moraju testirati puno varijanti dijelova prije nego što otkriju koja konfiguracija uspješno povećava produkciju željenog svojstva.

Mnogi dijelovi nisu kompatibilni. Jednom kada se sustav izradi i unese u stanicu on može imati efekte na svog doma ina koje ne želimo ili koji nisu predviđeni. Kako bi umanjili neekvivalentne interakcije, znanstvenici razvijaju tzv. ortogonalni sustav koji u stanici može funkcionirati neovisno od prirodne mašinerije stanice. Još jedno rješenje za ovaj problem može biti fizičko izoliranje sintetskih sustava od ostatka stanice.

Varijabilnost može srušiti sustav. Sintetski biolozi moraju osigurati da sustav pouzdano radi. Molekularne aktivnosti u stanici su sklone nasumičnim fluktuacijama ili šumu. Varijabilnost u uvjetima rasta također može utjecati na ponašanje. Nasumično nastale genetske mutacije mogu na duži rok ubiti funkcionalnost celog sustava.

2.5. Pitanje bioetike, biozaštite i biosigurnosti

Radovi u kojima je objavljena ponovna sinteza genoma polio-virusa i virusa gripe iz 1918. godine vrlo živo ilustriraju kako *de novo* sinteza DNA može biti iskorištena za podizanje zabrinutosti vezane uz sigurnost sintetske biologije. Rasprave o biosigurnosti su se uglavnom fokusirale na pitanje tzv. dvostrukog korištenja. S jedne strane sintetska biologija može stvoriti produkte koji bi imali značajan pozitivan utjecaj na društvo, a s druge pak strane može stvoriti produkte koji bi imali poguban utjecaj. Cilj je raditi sigurnu znanost i izbjeći bilo kakvu zloupotrebu sintetske biologije.

Neki znanstvenici predlažu radikalniji pristup tom pitanju te predlažu da se uz fizičku zaštitu koristi i tzv. trofna i semantička zaštita. Trofna zaštita uključuje izradu novih i robusnijih formi auktrotrofije, a semantička zaštita znači stvaranje potpuno novih tzv. ortogonalnih vrsta života koji ne bi imali utjecaja na prirodne oblike života.

Rasprava, izrada smjernica, regulativa i zakona tek je na početku, no za sada nema razloga za pojačanu regulaciju izvan postojećih sigurnosnih regulativa s obzirom da sintetska biologija još nije sve ono što ima potencijal biti. U trenutku kada se to dogodi mogla bi se otvoriti neka nova pitanja zaštite i sigurnosti o kojima će trebati raspravljati.

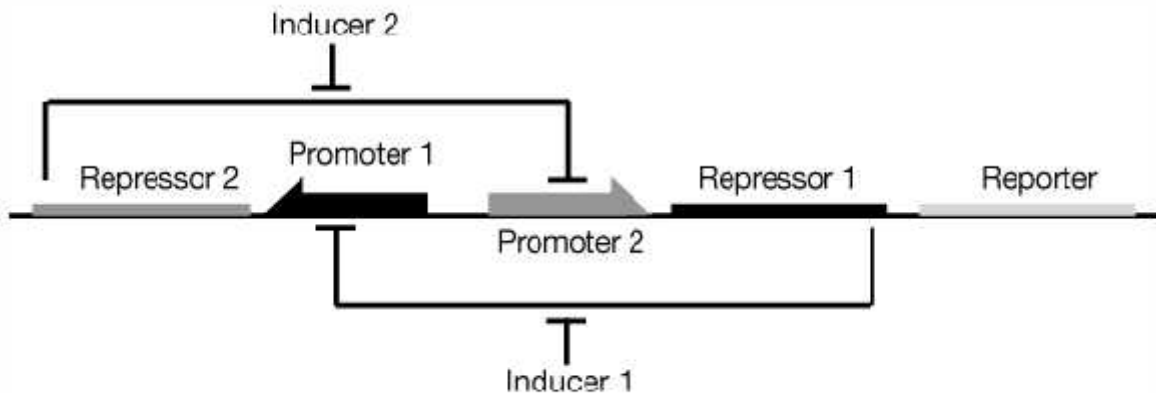
3. PRIMJENA SINTETSKE BIOLOGIJE

3.1. Sintetski geneti ki putevi

Zbog velikog povećanja našeg znanja o genskim komponentama i interakcijama u mnogim modelnim sustavima sada možemo tražiti komplementarni pristup kako bismo shvatili prirodne geneti ke puteve ili izradili nove putem rekonstrukcije geneti kih puteva. Možemo izraditi geneti ke puteve iz genskih komponenti koje su dobro karakterizirane i analizirati njihovo ponašanje u stanicama i organizmima. Ti putevi mogu biti bazirani na njihovim prirodnim dijelovima ili na teorijama kako bi prirodni proces mogao te i. Tako er mogu biti napravljeni na na in da rade što neovisnije od odgovaraju ih endogenih stani nih puteva. Geneti ki putevi mogu biti izra eni i prespajanjem postoje ih puteva tako da se dodaju, izbrišu ili promijene regulatorni dijelovi. Cilj prou avanja takvih rekonstruiranih geneti kih puteva je shva anje kako razli iti aspekti arhitekture puta pridonose funkciji, odre ivanje funkcionalnih kompromisa koji su inherentni dizajnu puteva i kako bi se utvrdila dostatnost pojedinog puta za neku biološku funkciju. Ovakav pristup geneti kim putevima dopušta nam dizajniranje puteva s jedinstvenim svojstvima te nam može dati uvid u osnovne mehanizme po kojima rade.

Pomo u sintetskog pristupa moglo bi biti mogu e izraditi repliku pojedinog prirodnog geneti kog puta i prou avati njegovu to nu funkciju u živim stanicama, te tako er bi se mogla testirati dostatnost nekog sintetskog puta koji ima odre enu funkciju izra enog od dobro karakteriziranih komponenti. Velika prednost ovakvog pristupa je što bismo mogli prou avati mehanizam nekog puta bez narušavanja stani nih funkcija ili induciranja nizvodnih doga aja koji su esto posljedica kod tradicionalnih pristupa narušavanja geneti kih puteva. Dizajn razli itih puteva sa sli nim funkcijama mogao bi se direktno usporediti kako bi se odredila precizna svojstva koja putu daje svaki dizajn kao i njihove me usobne prednosti i mane u pojedinom kontekstu u stanici. Na kraju, ovakva istraživanja mogla bi dati dovoljno dubok uvid i razumijevanje kako bi se mogli dizajnirati putevi koji stvaraju nove biološke funkcije te bi se moglo iskoristiti sintetske puteve za otkrivanje osnovnih principa o prirodnom dizajnu puteva.

Kao primjer u spomenuti pionirski korak u razvoju sintetskih puteva, a to je stvaranje bistabilnog (binarni ekspresijski sustav koji ne pokazuje nasumi ni prijelaz izme u dva ekspresijska stanja) ekspresijskog prekida a u *E. coli* (Gardner *i sur.* 2000.). Prekida (toggle switch) je konstruiran od dva inducibilna bakterijska represora prepisana s dva promotora sli ne ja ine i selektirana na na in da svaki represor inhibira promotor suprotnog represora (Slika 2.). Postavljanjem fluorescentnog gena reportera (GFP) nizvodno od jednog od represora bilo je mogu e promatrati koji je represor trenutno aktivan te na taj na in vidjeti ekspresijski status geneti kog puta. Zbog me usobne inhibicije dva gena represora geneti ki put je mogao biti u jednom od dva stanja – u visokom stanju u kojem se prvi represor i nizvodni GFP reporter prepisuju s drugog promotora ili u niskom stanju gdje se drugi represor prepisuje s prvog promotora. Dodavanjem odgovaraju eg induktora, neke kemikalije ili pomo u termalne indukcije, mogu e je prebaciti sustav iz jednog stanja u drugo stanje. Dizajnirano je i karakterizirano šest razli itih prekida a koji koriste razli ite promotorsko-represorske parove. Kao prakti na naprava ovakav prekida predstavlja pristupa nu sintetsku stani nu memorijsku jedinicu i ima implikacije na podru je biotehnologije, bioinformatike i genske terapije.



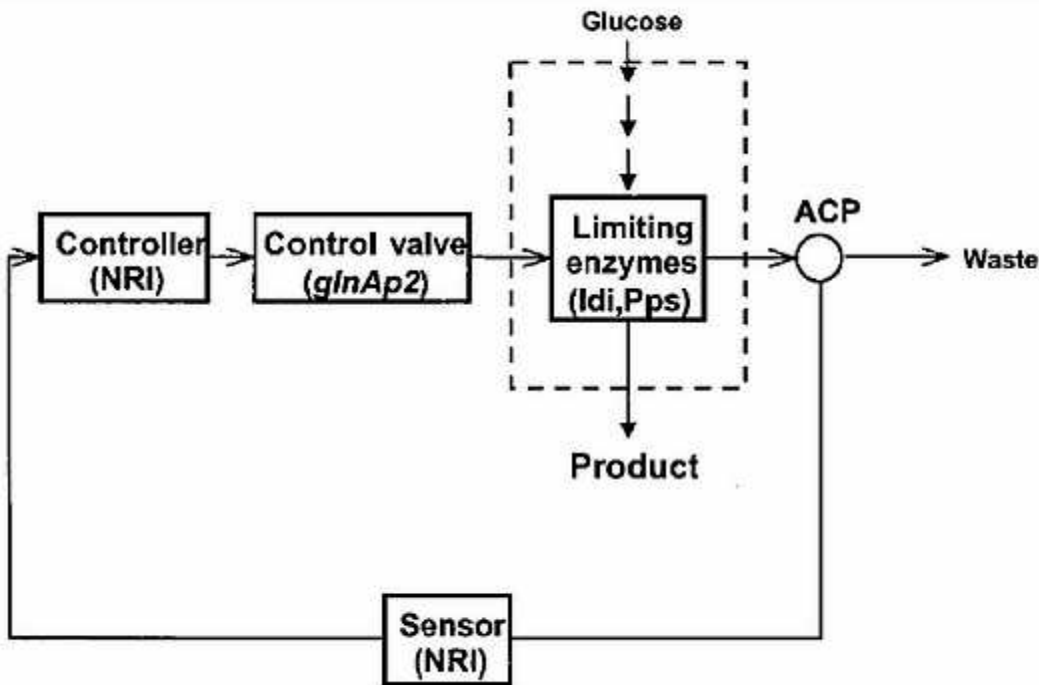
Slika 2. Dizajn prekida a. Represor 1 inhibira transkripciju s Promotora 1i induciran je s Inducerom 1. Represor 2 inhibira transkripciju s promotora 2 i induciran je s Inducerom 2. (Gardner *i sur.* 2000.)

3.2. Sintetski metaboli ki putevi

Sveukupna svojstva nekog puta su rijetko zbroj svojstava svake pojedina ne komponente tog puta. U *in vivo* sustavu su te pojedina ne komponente u me usobnoj interakciji tako da je za potpuni opis ponašanja nekog organizma potrebno znati me usobnu povezanost puta i njegovu topologiju kao i biokemijska svojstva svake pojedine komponente. Dok redukcionisti ki pristup pokušava odrediti biokemijska svojstva svake pojedina ne komponente, sistemski pristup je fokusiran na objašnjavanje me usobne povezanosti. Iako ova dva komplementarna pristupa imaju potencijala karakterizirati ponašanje biološkog sustava, esto ne postižu principe dizajna kompleksnih puteva. Zbog milijuna godina evolucije postoje i unutarstani ni putevi su zakomplicirani mnogim pomo nim putevima koji mogu prekriti osnovni princip dizajna sustava. Stoga je jako teško odgonetnuti osnovne principe tako da se objasni svaka pojedina komponenta. U alternativnom sintetskom pristupu stvaraju se hipotetski principi funkcioniranja koji se zatim testiraju pomo u umjetno sintetiziranih puteva. Na taj na in se mogu izbje i funkcije drugog reda koje nisu važne za temeljni princip. Tako er, sintetski putevi nisu limitirani prirodnim biološkim sistemom što omogu ava širi raspon uvjeta testiranja. U sadašnjem stupnju razvoja principi su inspirirani fizikalnim i matemati kim uvidima, ali ih ograni ava biološka i kemijska stvarnost. Naj eš e je nužan matemati ki model koji predstavlja temeljni koncept, a zatim se implementiraju biološke komponente poput promotora, regulatora, enzima i metabolita. Na kraju se napravljeni put rekonstituira unutar stanice kako bi se testirala svojstva sustava.

Kao primjer sintetskog metaboli kog puta iskoristit u pokušaj poboljšanja stvaranja likopena u *E. coli* (Farmer i Liao 2000.). Stvaranje umjetnog sustava omogu uje istraživanje mogu ih primjena i svojstava koji se ne nalaze u prirodnom stanju. Primjer toga je dinami na metaboli ka povratna veza koja predstavlja osnovni izazov u metaboli kom inženjerstvu kada je potrebno o uvati balans resursa u stanici, odnosno balans izme u rasta stanice i proizvodnje metabolita. U ovom radu je izra en sintetski kontrolor povratne veze u *E. coli* koji omogu ava ekspresiju gena za klju ne enzime u putu proizvodnje likopena (Slika 3.). Taj kontrolor je pod kontrolom metabolita – acetil-fosfata. Kada *E. coli* raste na glukozi ona proizvodi acetat koji je metaboli ki otpad kada ciklus trikarboksilne kiseline (ciklus limunske kiseline) više nije u mogu nosti prihva ati nadolaze i glikoliti ki tok. Stvaranje acetata tako er služi kao indikator

da stanice imaju dovoljno energije i resursa te stoga predstavlja odličnu priliku kako bi se stani ni resursi preusmjerili s rasta stanice na proizvodnju metabolita. Kada razina acetata naraste, razina njegovog prekursora acetil-fosfata također naraste i aktivira stvaranje likopena. Takva unutarstanična kontrolna petlja značajno pojačava stvaranje likopena i umanjuje negativan utjecaj izazvan metaboličkom neravnotežom.



Slika 3. Strategija dizajna dinamičkog kontrolera. Proces koji se želi kontrolirati je metabolitički put od glukoze do željenog likopena uz stvaranje metaboličkog signala, acetata. Mjerena varijabla ili signal je acetil-fosfat (ACP) koji služi kao signal za višak toka prema metaboličkom sustavu. Protein NRI je senzor koji također služi kao kontroler tako što se veže na DNA i modulira transkripciju. Kontrolni ventil je *glnAp2* promotor koji kontrolira limitirajuće korake *Idi* i *Pps* u metaboličkom sustavu. Isprekidane crte označavaju metabolički sustav koji je kontroliran. (Farmer i Liao 2000.)

3.3. Je li sintetska genomika stvorila novi sintetski život?

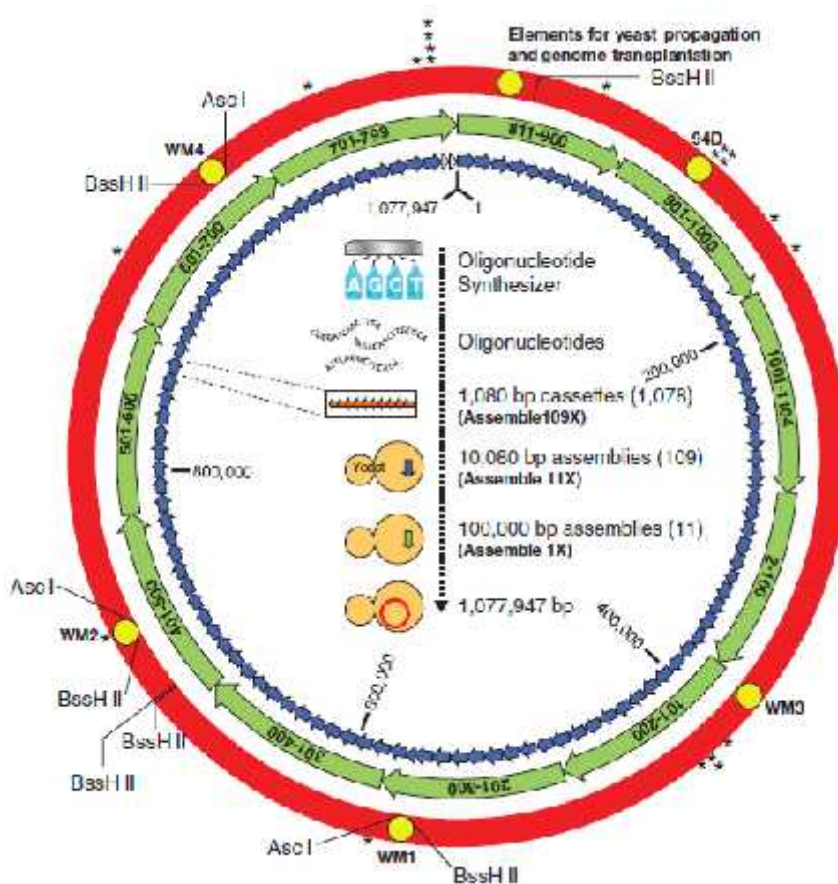
Do danas je sintetizirano jako malo genoma, a samo jedan funkcionira u živoj stanici na na in da raste i dalje se razmnožava. Radi se o svjetski poznatoj sintetskoj bakteriji *Synthiji* koja je prošle godine digla mnogo prašine jer je prezentirana kao stvaranje novog života (Gibson *i sur.* 2010b.). Mnogi znanstvenici su se usprotivili takvoj tvrdnji jer se radilo o sintetskoj kopiji ve postoje eg sekvenciranog genoma bakterije *Mycoplasma mycoides* veli ine nešto više od milijun parova baza (za usporedbu, ljudski genom ima tri milijarde parova baza). Ta sintetska kopija je zatim transplantirana u stanicu doma ina bakteriju *Mycoplasma capricolum*. Sintetski genom je uspješno preuzeo kontrolu nad tom stanicom i po eo je sintetizirati vlastite produkte te je stanica rasla i razmnožavala se sa sintetskim genomom. S obzirom da je taj sintetski genom imao neznatne promjene koje nisu zna ajno utjecale na njegov rad poput dodanih sekvenci „vodenih žigova“ kako bi se lakše prepoznalo da se radi o sintetskom genomu, namjerno napravljene delecije, nekoliko polimorfizama nukleotida i nekoliko dodanih elemenata za razvoj u kvascu i transplantaciji genoma može se ustvrditi da se radi o kopiji genoma koji se nalazi u prirodi. Zbog toga se slažem da se ne radi o kreaciji novog života jer nije uvedeno ili osmišljeno nikakvo novo svojstvo ili karakteristika koja ve nije poznata u prirodi.

No, taj je rad zna ajan jer prvi pokazuje tehniku kako bismo mogli sintetizirati genom i staviti ga u uvjete u kojima funkcionira. To je pionirski posao na kojem je desetak godina radilo mnogo znanstvenika pri emu su potrošena velika sredstva, ali kada se jednom to napravilo i kada se shvatila tehnologija kojom se to može napraviti budu i takvi poduhvati trebali bi biti mnogo efikasniji u svim aspektima.

Postavlja se pitanje kako sintetizirati jedan takav genom. Za po etak važno je imati genom koji je kvalitetno sekvenciran tako da se pri njegovoj sintezi ne pojavljuju greške koje mogu biti fatalne za funkciju tog genoma. Zatim se taj genom kompjutorski (de)konstruira na na in da se podijeli na mnogo manjih dijelova i da se ubace sve potrebne sekvence za uspješan eksperiment. Takvi mali dijelovi genoma (oligonukleotidi) se kemijski sintetiziraju i metodama molekularne biologije se spoje tako da ine itav genom. To se mora raditi u nekoliko koraka na na in da prvo od malih dijelova dobijemo nekoliko ve ih dijelova, zatim spajanjem tih ve ih

dijelova dobijemo još ve e dijelove te na kraju složimo itav genom. Svaki manji dio tog genoma mora biti konstruiran i sintetiziran tako da mu se krajevi preklapaju sa susjednim dijelovima kako bi ih se u kvascu pomo u homologne rekombinacije moglo spojiti. U svakom me ukoraku trebaju postojati kontrole i analize je li se dobio upravo onakav segment kakav smo željeli. Problem je i manipulacija tako velikim i krhkim komadima DNA te njihov prijenos u novu stanicu. Prikazan je pojednostavljen princip koji stoji iza tako jednog slaganja genoma (Slika 4.).

Ono što daje nadu jest rad koji je objavljen krajem prošle godine u časopisu *Nature Methods* (Gibson *i sur.* 2010a.) koji ukazuje da se tehnika sinteze manjih genoma polako kreće prema relativno rutinskom postupku. Naime, znanstvenici su uspjeli napraviti sintetski genom mitohondrija miša veličine oko šesnaest tisuća parova baza i opisuju tehnike kojima su to učinili. Autori predviđaju da bi rutinski postupak sinteze takvog genoma trajao samo oko pet dana (Slika 5.).



Slika 4. Slaganje sintetskog genoma *Mycoplasma mycoides* u kvascu. (Gibson *i sur.* 2010b.)

1. Pool oligos/Assemble/Transform *E. coli* (~3hours)
2. Colony formation/Colony growth in medium/DNA preparation (~24 hours)
3. DNA sequencing (~8 hours)
4. Repeat process to obtain 300-bp segments not obtained in first round (~33 hours)
5. Pool correct clones to be assembled/Digest/Assemble (~4 hours)
6. PCR from assembly reactions (~2 hours)
7. Repeat steps 5 and 6 (~6 hours)
8. Pool/Digest/Assemble into a vector/Transform *E. coli* (~6 hours)
9. Colony formation/Colony growth in medium/DNA preparation (~24 hours)
10. DNA sequencing (~8 hours)

Slika 5. Koraci i potrebno vrijeme za sintezu mitohondrijskog genoma miša. (Gibson *i sur.* 2010a.)

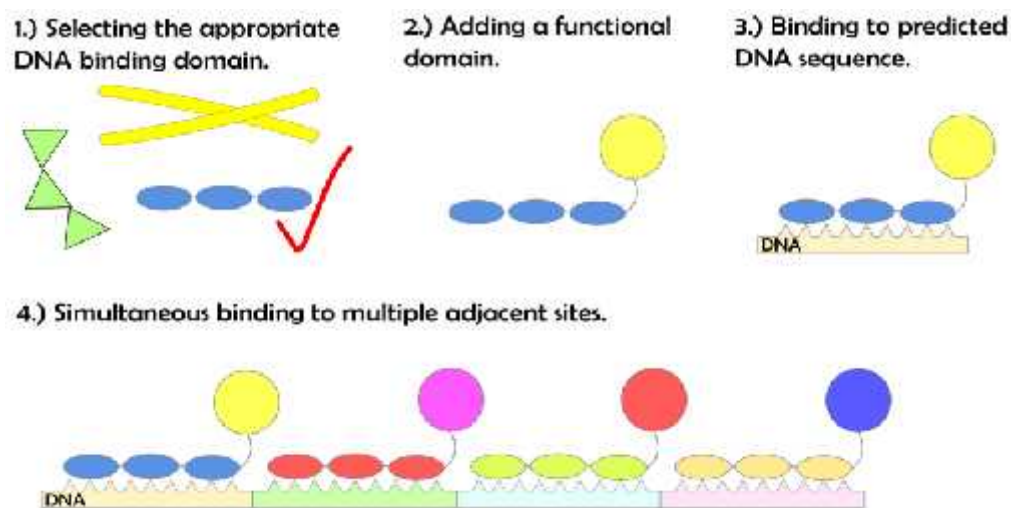
3.4. iGEM

2004. godine na MIT-u je osnovano natjecanje studenata u području sintetske biologije. To natjecanje je nazvano iGEM – International Genetically Engineered Machine. Prve godine je na njemu sudjelovalo samo pet timova, a danas na njemu sudjeluje više od sto timova i tisu u studenata s različitih svjetskih sveučilišta. Studenti svake godine dobiju biološke dijelove iz baze podataka (MIT Registry of Standard Biological Parts) te imaju godinu ljeta kako bi iskoristili te dijelove i dijelove koje sami osmisle u izgradnji biološkog sustava koji radi u živim stanicama. Uspješni projekti proizvode stanice koje pokazuju nova i neobična svojstva tako što izgrade stotine više gena i mehanizme koji reguliraju njihovu ekspresiju.

Širi ciljevi iGEM-a uključuju stvaranje sistematičnog inženjeringa u biologiji, promoviranje otvorenog i transparentnog razvoja inženjerskih alata u biologiji i stvaranje zajednice koja će moći i produktivno primijeniti biološku tehnologiju. Zanimljivo je da je u posljednjih pet godina tim iz Slovenije tri puta osvojio zlatnu medalju, a dalje u tekstu mogu opisati njihov projekt s kojim su na posljednjem natjecanju osvojili zlatnu medalju.

Informacija koja je kodirana u tripletima nukleotida DNA određuje red ugradnje aminokiselina u protein. Oni su pak DNA iskoristili na alternativan način koristeći ju kao nosa

za kodiranje informacije. Sekvencu DNA su iskoristili kao program koji se sastoji od serije blokova od devet ili više nukleotida. Ako se dodaju željeni funkcionalni proteini koji imaju fuzioniranu domenu vezanja na DNA koja se veže na te blokove DNA, funkcionalni proteini se spontano poslože duž molekule DNA u definiranom redu ovisno samo o programu sekvence DNA (Slika 6.). Ta „pokretna traka“ vo ena molekulom DNA daje poprilično snažan alat za inženjering biosintetskih puteva. Oni su selektirali šest različitih cinkovih prstena i odredili su njihovo vezanje s odgovarajućom sekvencom DNA pomoću tri različite metode. Mogu u primjenu u stvarnom svijetu su demonstrirali na biosintetskom putu violaceina koji se sastoji od pet enzima. Prirodni biosintetski put violaceina stvara i velike količine zelenog produkta deoksikromoviridansa koji je u dizajniranom putu bio odsutan. Nadalje, prinos violaceina je bio šest puta veći u prisutnosti DNA programa koji je kodirao linearni poredak enzima u odnosu na proizvoljni poredak enzima što pokazuje da je toan poredak enzima u biosintetskom putu važniji od samog okupljanja enzima. Ovaj projekt je pokazao mogućnost nove i drugačije primjene DNA kao nosa informacije u sintetskoj biologiji. S preko 700 dostupnih karakteriziranih cinkovih prstiju moguće je gotovo beskonačan broj kombinacija što predstavlja jaku potporu u razvoju sintetske biologije kao inženjerske znanosti. Kratki video priloga slovenskog tima koji objašnjava ideju i princip njihovog projekta može se pronaći na internet adresi <http://www.youtube.com/watch?v=jVA6qS8YPgg>.



Slika 6. Shematski prikaz koraka u vezanju enzima i DNA. <http://ung.igem.org/>

4. ZAKLJUČAK

Sintetska biologija je grana znanosti koja se nalazi na samom početku razvoja. Manipulacija biološkim sustavima kako ju je postavila sintetska biologija pruža veliki potencijal za buduća otkrića, kako fundamentalna tako i primijenjena. Komercijalna vrijednost koju bi trebala doseći i kroz bioproizvodnu industriju se do 2016. godine procijenjuje na 3 milijarde dolara, a do 2026. godine na čak 10 000 milijardi dolara. Najveći projekt u povijesti znanosti je dobila upravo sintetska biologija za istraživanje biogoriva u iznosu od jedne milijarde dolara. Uz stvaranje novih biogoriva, najveći potencijal ima u poboljšanju ljudskog zdravlja i kvalitete života putem stvaranja novih lijekova i cjepiva, poboljšanjem okoliša ili primijenom u poljoprivredi. Pri svemu tome ne smiju se zaboraviti bioetičke, biosigurnosne i biozaštitne implikacije koje u ljudima izazivaju golemi strah koji ne smije biti zanemaren te se o tome veću još mnogobrojne rasprave i borbe za prihvaćanje svih reperkusija sintetske biologije. Dvadeset i prvo stoljeće je stoljeće biologije i još nas očekuju mnogobrojna uzbudljiva otkrića na tom području.

5. LITERATURA

Benner S., 2008. Biology from the bottom up. *Nature* **452**, 692-694.

Elowitz M., Lim W.A., 2010. Build life to understand it. *Nature* **468**, 889-890.

Farmer W.R., Liao J.C., 2000. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nature Biotechnology* **18**, 533-537.

Gardner T.S. *i sur.*, 2000. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* **403**, 339-342.

Gibson D.G. *i sur.*, 2010a. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nature Methods* **7**, 901-903.

Gibson D.G. *i sur.*, 2010b. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**, 52-56.

Kwok R., 2010. Five hard truths for synthetic biology. *Nature* **463**, 288-290.

Pengcheng F., Panke S., 2009. Systems biology and synthetic biology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Interdisciplinary research team summaries, 2010. Synthetic biology – building on nature's inspiration. The National Academies press, Washington, D.C.

<http://en.wikipedia.org/wiki/IGEM>

http://en.wikipedia.org/wiki/Synthetic_biology

<http://parts.mit.edu/>

<http://syntheticbiology.org/>

<http://ung.igem.org/>

6. SAŽETAK

Sintetska biologija je mlada grana znanosti koja se poela razvijati tek u zadnjih deset godina. Ona se preklapa i nadopunjava sa sistemskom biologijom. Koristi različite metode iz različitih grana znanosti poput matematike, fizike, kemije, biologije, računalnih znanosti i inženjerstva. Cilj joj je stvoriti nove vrste života ili mijenjati postojeće žive sustave kako bi uvela neke nove funkcije u biološke organizme. Zbog toga je jako osjetljiva na pitanja bioetike, biosigurnosti i biozaštite. Njezina primjena je raznolika, a najviše se koristi u stvaranju novih biogoriva i lijekova.

U drugom dijelu ovog rada opisane su neke primjene sintetske biologije iz područja sintetskih genetskih puteva, sintetskih metaboličkih puteva, sintetske genomike te natjecanje iz područja sintetske biologije za studente iz svih dijelova svijeta.

7. SUMMARY

Synthetic biology is a young scientific discipline which started to develop in the last ten years. It is complementary to and interdependent with systems biology. It uses methods from different scientific disciplines like mathematics, physics, chemistry, biology, computer sciences and engineering. Its goal is to make new life forms or to change existing living systems and thus introduce some novel functions into biological organism. Because of this, it is very sensitive to questions of bioethics, biosafety and biosecurity. Its applications are vast, but it is mostly used for creating new biofuels and drugs.

In the second part of this seminar I described different applications of synthetic biology in the fields of synthetic gene circuits, synthetic metabolic networks, synthetic genomics and finally, the iGEM competition in synthetic biology for students from all around the world.